

AF

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-291461

(P2002-291461A)

(43) 公開日 平成14年10月8日 (2002. 10. 8)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 9
A 6 1 L 27/00		A 6 1 L 27/00	C 4 B 0 3 3
C 1 2 M 3/00		C 1 2 M 3/00	A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 11/10	4 C 0 8 1
11/10		5/00	E
審査請求 有 請求項の数14 O L (全 8 頁)			

(21) 出願番号 特願2001-96445(P2001-96445)

(22) 出願日 平成13年3月29日 (2001. 3. 29)

(71) 出願人 59810/703

西村 紳一郎

北海道札幌市中央区北9条西16丁目1-1-302

(71) 出願人 000241957

北海道電力株式会社

北海道札幌市中央区大通東1丁目2番地

(71) 出願人 500503551

株式会社生物有機化学研究所

北海道札幌市清田区美しが丘四条9丁目2番1号

(74) 代理人 100062144

弁理士 青山 稔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 軟骨細胞培養方法および軟骨組織再生基材

(57) 【要約】

【課題】 軟骨欠損の修復に好適な軟骨組織移植用基材を提供する。

【解決手段】 酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体を含む成形物を培養担体として軟骨細胞を培養することにより、本発明の課題を解決することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体を少なくともその表面に含む成形物よりなる軟骨細胞培養用の担体。

【請求項2】 成形物が非局所的に酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体を含む請求項1に記載の担体。

【請求項3】 成形物の表面に酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体を含む請求項1に記載の担体。

【請求項4】 酸性生体高分子又は塩基性生体高分子の表面が酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体で被覆されている請求項3に記載の担体。

【請求項5】 複合体の成形物が繊維である請求項1～4のいずれかに記載の担体。

【請求項6】 複合体の成形物が膜である請求項1～4のいずれかに記載の担体。

【請求項7】 複合体の成形物が、繊維集合体、織物、編物、又は不織布である請求項5に記載の担体。

【請求項8】 酸性生体高分子が、カルボキシル基、硫酸基、スルホン酸基、またはリン酸基を有する請求項1～7のいずれかに記載の担体。

【請求項9】 酸性生体高分子がアルギン酸、ヒアルロン酸、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸よりなる群から選択される請求項8に記載の担体。

【請求項10】 塩基性生体高分子が、アミノ酸、イミノ基、又はグアジニノ基を有する請求項1～9のいずれかに記載の担体。

【請求項11】 塩基性生体高分子がキトサン、ポリリジン、又はポリアルギニンである請求項10に記載の担体。

【請求項12】 酸性生体高分子がアルギン酸であり、塩基性生体高分子がキトサンである請求項9又は11に記載の担体。

【請求項13】 請求項1～12のいずれかに記載の担体を培養担体として用いて軟骨細胞を生体外で培養することを含む軟骨細胞の培養方法。

【請求項14】 請求項1～12のいずれかに記載の担体、及び該担体を被覆する軟骨細胞を含む移植用軟骨組織再生基材。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、生体外で軟骨細胞を培養し軟骨組織に分化させる軟骨細胞培養方法、該方法に用いる3次元培養担体、及び該方法により得られる軟骨損傷または欠損部位を再生させるための移植用軟骨組織再生基材に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 現在、社会の高齢化を迎え変形性関節症や慢性リウマチによる関節に傷害をもつ患者の増加、ま

た輸送手段の発達に伴う交通外傷および日常生活へのスポーツの浸透によるスポーツ外傷の増加等、医療全体に占める運動器疾患の割合が増加しており今後もさらにその傾向は続くと予測される。

【0003】 これらの関節疾患の大部分は軟骨組織が損傷を受けることが原因となっている。現在、金属と高分子量のポリエチレンとからなる人工関節がその治療に用いられている。しかしながら、埋め込み後10年以上経過すると摩耗し、磨耗粉により種々の望ましくない生体反応が引き起こされるようになる。これらの問題を解決するため耐摩耗性を向上させる研究が行われているが、耐摩耗性において限界が予測される。

【0004】 新たな解決方法として組織再生工学技術を利用した関節軟骨傷害の治療が注目されている。この治療方法は傷害部に培養した軟骨細胞またはそれより作り出した軟骨組織を移植すること、生体外で培養した軟骨細胞をコートしたマテリアルを鋳型として用いて治療する方法が考えられている。

【0005】 この際重要になるのが、軟骨細胞を生体外で培養し軟骨組織に分化させる大量細胞培養技術である。軟骨組織は、軟骨細胞と軟骨細胞が分裂、増殖しながら産生する細胞外マトリックス（基質）からなる。軟骨細胞は一般に分裂・増殖能力が低く、細胞外マトリックス産生能も弱いと云われているが、最近生体外で細胞をその機能を保持しつつ増殖させる培養方法として適当な3次元培養担体を用いることが有効であることが判明してきた。さらに生体組織工学の進展により軟骨組織を再構築するためには軟骨細胞の3次元培養担体として生分解性・生体適合性基材が重要であり、これまで上記の3次元的な生分解性基材としてポリ乳酸(PLA)やポリグリコール酸(PGA)、及びそれらの共重合体(PLGA)などの合成高分子材料、およびコラーゲン、リン酸キチンなどの天然高分子材料がよく研究されてきている[S. J. Peter, M. J. Miller, A. W. Yasko, M. J. Yaszemski, A. G. Mikos, J. Biomed. Mater. Res., 43, 422-427(1998); L. E. Freed, G. Vunjak-Novakovic, R. Langer, R. J. Biron, D. B. Eagles, D. C. Lesnoy, S. K. Barlow, R. Langer, Bio/Technology, 12, 689-693(1994); G. Chen, T. Ushida, T. Tateishi, Chem. Lett. 561-562 (1999); 西澤かおり、横川善之、永田夫久江、穂純 篤、寺岡 啓、亀山 哲也、河合 達志：平成12年度日本生物工学会講演要旨集 102. (2000)]。

【0006】 しかしながら、PLA、PGA、PLGAなどは機械的強度があり成形することは容易であるが、細胞との接着性や生体親和性が欠けている。一方、コラーゲンは、細胞との生体親和性に優れているが、機械的強度が劣るための確な形態を付与することは難しい。そこでPLGAとコラーゲンを複合化させた培養担体を開発し、それを用いて軟骨細胞を培養し、軟骨細胞の機能発現について検討されている。その結果、PLGA、コラーゲン単独よ

り強度、細胞の接着性、細胞培養においてそれぞれ優れた結果を得ているが、更に細胞培養時間の短縮、タイプIIコラーゲンなどの有用な細胞外マトリックスの早期形成など改善が望まれている。このほか軟骨細胞の培養系になんらかの操作を加えることによりその分裂・増殖能を高め、最終的に細胞外マトリックスの産生能を高めようとする研究が行われているが、現時点では細胞外マトリックスの軟骨細胞の産生能力には限界があり、広範な軟骨欠損の修復は困難である。

#### 【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は従来技術における上記課題を解決するためになされたものである。即ち、本発明は、軟骨損傷又は欠損部位を再生させるための、生分解性、生体適合性を有し、十分な機械的強度を保持する軟骨組織再生用基材を提供することを目的とする。本発明はまた、そのような軟骨組織再生用基材を製造する方法を提供することを目的とする。本発明はさらに該軟骨組織再生用基材を製造するのに適する軟骨細胞培養用の担体を提供することをも目的とする。

#### 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者は、軟骨細胞の培養方法について鋭意研究を重ねた結果、人工の細胞外マトリックスとして酸性生体高分子と塩基性生体高分子の複合体の成形物を培養担体として用いることにより、軟骨損傷又は欠損部位を再生させるに適した、生分解性、生体適合性を有し、十分な機械的強度を保持する軟骨組織再生用基材が得られることを見出し、この知見に基づいて本発明をなすに至った。即ち、本発明は先ず、酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体を少なくともその表面に含む成形物よりなる軟骨細胞培養用の担体に関する。本発明はまた、該担体を培養担体として用いて軟骨細胞を生体外で培養することを含む軟骨細胞の培養方法にも関する。本発明はさらに、上記の担体及び該担体を被覆する軟骨細胞を含む移植用軟骨組織再生基材にも関する。

【0009】本明細書で用いる「酸性生体高分子」とは、カルボキシル基、硫酸基、スルホン酸基、リン酸基等の酸性の基、またはその塩を有する天然に由来する高分子をいう。好ましい態様では生体高分子は多糖類である。天然に存在する高分子を加水分解に付して上記酸性基またはその塩を生じさせたものも「酸性生体高分子」に含む。また、天然に存在する生体高分子をいずれかの物理的、化学的、あるいは酵素的手段により低分子量化したものも「酸性生体高分子」に含む。しかしながら、酸性生体高分子の分子量は少なくとも50,000、好ましくは少なくとも100,000であることが必要である。

【0010】カルボキシル基を有する酸性生体高分子の例としては、グルコン酸、グルクロン酸、イズロン産、D-マンヌロン酸、ガラクトuron酸、グルロン酸、シアル酸を含むポリマー、例えばヒアルロン酸、アルギン酸、

ヘパリン等が挙げられる。

【0011】硫酸基を有する酸性生体高分子の例としてはヘパリン、ヘパラン硫酸等が挙げられる。リン酸基を有する酸性生体高分子の例としてはDNA、RNA等が挙げられる。複合体の製造においてこれらの酸性生体高分子の2種以上を用いてよい。

【0012】本明細書において「塩基性生体高分子」とはアミノ基、イミノ基、グアニノ基等の塩基性またはその塩を有する天然に由来する高分子をいう。天然に存在する生体高分子を加水分解に付して上記塩基性またはその塩を生じさせたものも「塩基性生体高分子」に含む。また天然に存在する高分子をいずれかの物理的、化学的、あるいは、酵素的手段により低分子量化したものも「塩基性生体高分子」に含む。しかしながら、塩基性生体高分子の分子量は少なくとも300、好ましくは少なくとも700、より好ましくは少なくとも1,000であることが必要である。塩基性生体高分子の例はキトサン、ポリアミン、ポリリジン、ポリアルギニン、ポリガラクトサミン、ヒストン、クロマチンである。複合体の製造においてこれらの塩基性生体高分子の2種以上を用いてもよい。

【0013】酸性生体高分子と塩基性生体高分子の好ましい組み合わせの例は、アルギン酸-キトサン、アルギン酸-ポリリジン、アルギン酸-ポリアルギニン、ヒアルロン酸-キトサン、ヒアルロン酸-ポリリジン、ヒアルロン酸-ポリアルギニン等であるが、これらに限定されない。

【0014】負の電荷を有する酸性生体高分子と正の電荷を有する塩基性生体高分子の間の静電的相互作用により複合体が形成される。本発明の複合体における酸性生体高分子と塩基性生体高分子との割合は、酸性生体高分子100重量部に対して、塩基性生体高分子0.02~2.0重量部、好ましくは0.5~1.5重量部である。これらの複合体は生体親和性と生体適合性および生分解性を保持し、生体への移植に適した性質を有する。

【0015】本発明の軟骨細胞培養用の担体は酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体を少なくともその表面に含む成形物よりなる。好ましくは、成形物は繊維または膜である。1の態様では該成形物は非局所的に、即ち全体的に、酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体を含む。他の態様では、該成形物の表面に酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体を含む。

【0016】先ず第一の態様の成形物の製造方法について説明する。

(1) 酸性生体高分子と塩基性生体高分子の複合体の溶液を調製し；

(2) 該複合体の溶液を、アルカリ土類金属塩を含む水溶液からなる第1凝固浴中に押し出して複合体を凝固させ；

(3) 該凝固物を、アルカリ土類金属塩を含む水/アル

コール溶液からなる第2凝固浴に浸漬し;

(4) 場合により該凝固物を延伸する。

【0017】複合体の溶液は、例えば、酸性生体高分子の溶液と塩基性生体高分子の溶液を混合すれば得ることができる。好ましい態様では溶媒は水であり、それぞれの成分の水溶液を混合することにより複合体の水溶液を容易に得ることができる。

【0018】第1凝固浴としては、水溶性のアルカリ土類金属の塩を水に溶解した溶液が使用される。アルカリ土金属塩としてはカルシウム塩、バリウム塩、マグネシウム塩等が挙げられるが塩化カルシウムが好ましい。これらの金属塩を混合して使用することも可能である。金属塩の濃度は1~5%範囲で使用できる。塩化カルシウムの場合3%が好ましい濃度であるが、複合体の種類により異なることは言うまでもない。

【0019】また第2凝固浴は、水/アルコール混合溶媒にその混合溶媒に可溶のアルカリ土類金属塩を溶解した溶液が使用できる。アルカリ土類金属塩としてはカルシウム塩、バリウム塩、マグネシウム塩等が挙げられるが塩化カルシウムが好ましい。これらの金属塩を混合して使用することも可能である。金属塩の濃度は1~5%範囲で使用できる。塩化カルシウムの場合3%が好ましい濃度であるが、複合体の種類により異なることは言うまでもない。混合溶媒に使用するアルコールとしてはメタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール等を挙げることができるが、メタノールが好ましい。水/アルコールの割合は、10/90~70/30(容量/容量)、好ましくは45/55~55/45(容量/容量)とする。

【0020】本発明の成形物が繊維である場合には、例えば以下のようにして製造することができる。複合体溶液を適当な紡糸ノズルから第1凝固浴槽に押し出し、次に第2凝固浴槽に移した後、第1ローラーと第2ローラーで適切な延伸倍率で延伸した後、巻き取りローラーで巻き取る。このようにして巻き取った繊維はアルコールなどに浸漬し、洗浄後、風乾する。

【0021】本発明の成形物が膜である場合には、例えば以下のようにして製造することができる。複合体溶液を適当なスリットから第1凝固浴槽に押し出し、次に第2凝固浴槽に移した後、第1ローラーと第2ローラーで適切な圧延倍率で圧延延伸した後、巻き取りローラーで巻き取る。このようにして巻き取った膜はアルコールなどに浸漬洗浄後、風乾する。

【0022】繊維の直径は20 $\mu$ m以下が望ましく、好ましくは5~15 $\mu$ mがよい。膜厚は0.5mm程度が好ましい。傷害部に密着できる鋳型に軟骨細胞より再生された骨様組織をそのまま移植する場合は、また、より骨組織に近い組織に分化させる場合、それに適した構造体を検討することが必要であるので上記の繊維、膜特性に限定されないことは言うまでもない。

【0023】第二の態様の成形物は以下のようにして製造する。

(1) 酸性生体高分子又は塩基性生体高分子の溶液を調製し;

(2) 該溶液を、アルカリ土類金属塩及び塩基性生体高分子又は酸性生体高分子を含む水溶液からなる第1凝固浴中に押し出して複合体を凝固させ;

(3) 該凝固物を、アルカリ土類金属塩を含む水/アルコール溶液からなる第2凝固浴に浸漬し;

(4) 場合により該凝固物を延伸する。

工程(1)で酸性生体高分子を用いた場合には工程

(2)では塩基性生体高分子を用い、工程(1)で塩基性生体高分子を用いた場合には工程(2)では酸性生体高分子を用いる。他の成形条件は第一の態様における条件と同様の条件を用いることができる。第1凝固浴で酸性生体高分子又は塩基性生体高分子が凝固し、その表面で酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体が形成される。

【0024】本発明ではこのようにして得られた成形物を軟骨細胞の培養担体として用いる。軟骨細胞を培養することにより成形物を被覆するように軟骨組織が形成される。従って、成形物を更に加工して、増殖した軟骨組織が占め得る3次元的空間を有する構造体とすることが好ましい。そのような構造体の例には、これらに限定されるものではないが、繊維を束ねた繊維集合体、織物、編物、不織布、膜を穿孔したもの、スポンジ状に加工したもの、折り重ねたもの等がある。更に、傷害部に密着できる鋳型に軟骨細胞より再生された骨様組織をそのまま移植する場合は、また、より骨組織に近い組織に分化させる場合、それに適した構造体を検討することが必要であるので上記の繊維、膜特性及び構造体に限定されないことは言うまでもない。

【0025】本発明の成形物は培養担体として以下のような好ましい性質を有する。

1) 軟骨細胞の培養において細胞の播種が容易であり、播種時、及び増殖した軟骨細胞が培養担体に吸着・接着する。

2) 軟骨細胞が担体の表面で増殖し、コラーゲンなど細胞外マトリックスが分泌され軟骨組織に分化する。

3) 形成された軟骨組織が占め得る3次元的空間を有する。

4) 生体適合性および生分解性を有し、適度の機械的強度を有する。

【0026】上記の3次元培養担体を用いる培養は通常の動物細胞培養法(例えば、Klagsburn, M., "Large Scale Preparation of Chondrocytes", Methods in Enzymol., 58:560(1979)を参照)に準じて行う。まず、予め、該培養担体をオートクレーブで加熱滅菌するか、ガス殺菌を行い形状・特性が壊れないように殺菌処理を施し、殺菌した培地に添加する。次に、軟骨細胞を培養担

体上にできるだけ3次元的に均一に播いて培養する。培養に使用する軟骨細胞としてはウサギ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、ヒト等の哺乳動物軟骨由来の軟骨細胞であれば、いずれの細胞でも培養可能である。好ましい軟骨細胞は、ヒト由来のものであり、特に好ましいのは移植しようとする患者由来の軟骨細胞である。

【0027】培地としては通常の動物細胞培養法で用いられるもの、例えば牛胎児血清を含むDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) などが使用出来る。従来の培養担体を用いて培養する場合、軟骨組織を再生させるためいずれかの成長因子、例えばTGF $\beta$ などの添加が必要があるが、このような方法は炎症細胞の誘導等の負の作用が認められる場合がある。本発明の培養担体を用いると、このような成長因子の添加なしに培養しても、細胞外マトリックスが分泌され、軟骨組織の再生が誘導される。

【0028】軟骨細胞の接種時において培養担体の上へ細胞が均一に播種できることが重要であり、このためには軟骨細胞付着・吸着性の高い培養担体は極めて重要である。培養温度は30℃～37℃である。培養器として小スケール培養ではコラーゲンをコーティングした6穴培養用プレートあるいは24穴プレートに培養担体を置いて培養するが、さらに大きなスケールでは大型のコラーゲン膜で皮覆したポリスチレン樹脂容器や角形培養フラスコ（ガラス製）等を使用する。

【0029】培養は、少なくとも細胞外マトリックスが形成されるまで行なう。通常、培養2～4週間程度で軟骨細胞が本発明の3次元培養担体の上に良好に接着、増殖し、コラーゲン様の細胞外マトリックスが形成される。

【0030】このようにして製造される、本発明の、酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体を含む成形物、及び該成形物を被覆する軟骨組織を含む基材は、軟骨損傷の修復のための移植用基材として好適に用いることができる。

【0031】以下に実施例を用いて本発明を説明するが、実施例により本発明の範囲が限定されるものではないことは勿論である。

#### 【実施例】製造例1

アルギン酸とキトサンのハイブリッド繊維(1)の製造  
アルギン酸濃度4%の条件で紡糸したアルギン酸単独繊維、アルギン酸濃度4%およびキトサン濃度0.035%で紡糸したアルギン酸-キトサンハイブリッド繊維1、およびアルギン酸濃度4%およびキトサン濃度0.05%で紡糸したアルギン酸-キトサンハイブリッド繊維2を調製した。4(重量/容量)%のアルギン酸ナトリウム(紀文フードケミファ社製、NSPH<sub>2</sub>、分子量600,000)水溶液を布で約0.5kgfcm<sup>-2</sup>で加圧濾過した。ろ液にキトサン(分子量985)を、その濃度が0.035(重量/容量)%となるように加え、攪

拌溶解し、減圧脱泡してアルギン酸-キトサン複合体の水溶液を調製し紡糸液とした。簡易紡糸装置を用いて紡糸を以下に行なった。50ホール(直径0.1mm)のノズルから、約0.6kgfcm<sup>-2</sup>の加圧条件で、塩化カルシウムの3(重量/容量)%水溶液(第1凝固浴:浴長40cm)に押し出し、次に塩化カルシウムの3(重量/容量)%水/メタノール(1/1(容量))溶液(第2凝固浴:浴長40cm)溶液に浸漬した後、ローラー(第1ローラー:速度7.6m/min、第2ローラー:速度7.8m/min;延伸倍率1.03)にかけ、最後に巻き取りローラーで巻き取りを行なった後、メタノールに約3時間浸漬し風乾させ、しなやかなアルギン酸-キトサンハイブリッド繊維(以下、「アルギン酸-キトサンハイブリッド繊維1」と呼ぶ)を得た。

#### 【0032】製造例2

アルギン酸とキトサンのハイブリッド繊維(2)の製造  
実施例1の方法において紡糸液中のキトサン濃度を0.05(重量/容量)%としたことを除いては製造例1と同様に紡糸液の調製、紡糸を行い、しなやかなアルギン酸-キトサンハイブリッド繊維(以下、「アルギン酸-キトサンハイブリッド繊維2」と呼ぶ)を得た。

#### 【0033】比較製造例3

アルギン酸単独の繊維

キトサンを加えないことを除けば製造例1の方法と同様にしてアルギン酸単独の繊維を得た。

#### 【0034】実施例1

アルギン酸とキトサンのハイブリッド繊維の軟骨細胞吸着試験

軟骨細胞をうまく培養するためには上記のように軟骨細胞が3次元培養担体に細胞を出来るだけ多く吸着・接着することが必要である。上記製造例で製造したアルギン酸単独の繊維、アルギン酸-キトサンハイブリッド繊維1及び2への軟骨細胞の吸着・接着性を検討した。コントロールとして市販の吸収性医療用糸、9.0 Vicryl (Polyglactin 910 (グリコリド及びラクチドの90:10 共重合体、polyglactin 370)及びステアリン酸カルシウムで被覆、Vicryl 縫合材料、EthiconCo., Somerville, NJ, 米国)を用いた。

#### 【0035】(1)ウサギ生体組織よりウサギ軟骨細胞の調製

軟骨細胞採取

日本白色家兔(ホクド(株)、8～10週令、体重1.8～2.0kg)を麻酔液(ネブタノール:生理食塩水=1:1)を耳介静脈より5～10cc(125mg/kg)を静脈注射した後、関節部を剃毛し、70%エタノールを霧吹きでかけさらにイソジンで消毒した。摘出操作では、関節軟骨面を傷つけないように注意して膝、股、肩関節で離断した。以後の操作で滑膜その他の細胞がコンタミネーションするのを防ぐため、軟部組織はなるべく剥離、切除しておく。摘出検体はゲンタシン

を加えた生理食塩水300mlに浸漬し、発泡スチロール内で水中で冷却保管した。

#### 【0036】細胞の分離

軟骨下骨を削らないように注意して、軟骨面のみを15番メスで削り、削り取った軟骨は生理食塩水をいれた滅菌シャーレに集めた。次に軟骨を滅菌した木板の上に載せて出来るだけ細かく刻んだ。軟骨細片を10mlピペットで吸飲し、50mlチューブに移し、生理食塩水を加え良く攪拌した後、1500回転、5分(37℃)で遠心分離を行った。上澄みを捨て再度生理食塩水を加えよく混ぜた後、再び遠心分離を行った。この操作を3回繰り返した。この操作後、上澄みの生理食塩水を捨て残った軟骨組織に0.25%トリプシン(フナコシ、Worthington Biochemical, 45-0037-36)20mlを加えよく攪拌した後、37℃の恒温振とう器(ヤマト科学、Personal-11)で25分間加温した。その後直ちに1500回転5分間遠心し、上澄みを除去した。次に、予めDMEM(D-グルコース 1000mg/L、L-グルタミン 4mM、ヒルビン酸ナトリウム 110mg/L、炭酸水素ナトリウム 3.7g/L)に溶解しておいた0.25%タイプ2コラーゲナーゼ(フナコシ、Worthington Biochemical, 45-1042-05)溶液20mlを加え恒温振とう器で37℃、4~6時間酵素反応を行わせ、肉眼的に軟骨片が無くなるまで処理した。この溶液をセルストレナーでろ過し、大きなかけらを除去した。この溶液を遠心分離(1500回転、5分)を行い上澄みを捨てDMEMを加えて洗浄した。この操作を3回繰り返し、3回目の遠心後培地を加えて5mlとした。12穴プレート(BioCoat Collagen1)に上記の方法で調製した軟骨細胞懸濁液50μl及び0.04%トリパンブルー50μlを加えヘモサイトメーターで細胞数をカウントした。

【0037】(2)軟骨細胞吸着・接着試験  
長さ2.5cm、内径4.8mmのテフロン(登録商標)チューブ内に1cmの長さに切った繊維を詰め、これに軟骨細胞(0.5×10<sup>6</sup>個)を添加し、室温で1時間インキュベートした後、PBS1mL(0.5mL×2回)で細胞を洗浄し、得られた洗浄液中の細胞をカウントし吸着・接着をしていない細胞数の割合を計算した。

#### 【0038】各種の繊維の軟骨細胞吸着・接着性の比較

【表1】各種の繊維の軟骨細胞吸着・接着性の比較

試料	細胞数(洗浄液中) / 添加軟骨細胞数(%)
	(平均±SD%) (n=5)
9-0 Vicryl	80.8±6.2%
アルギン酸繊維	33.0±4.6%
アルギン酸-キトサン繊維1	19.6±4.3%
アルギン酸-キトサン繊維2	16.6±4.4%

【0039】上の表に示すように9-0 Vicrylと生体高分子繊維の間には細胞吸着・接着性にANOVAによる統計的有意差があることが認められた。さらにアルギン酸単独の繊維とアルギン酸-キトサンハイブリッド繊維との間にも統計的有意差があり、吸着・接着性は本発明のハイブリッド繊維の方が大きいことが認められた。この実験よりアルギン酸-キトサンハイブリッド繊維が軟骨細胞の付着・吸着が優れている結果を得たので、次にアルギン酸濃度4%およびキトサン濃度0.05%で紡糸したアルギン酸-キトサンハイブリッド繊維2を培養担体として用いて軟骨細胞の培養を行なった。

#### 【0040】実施例2

アルギン酸とキトサンのハイブリッド繊維を培養担体として用い軟骨細胞培養ウサギ軟骨細胞の培養  
培地としてDMEM(フナコシ、D-グルコース 4500mg/L、L-グルタミン 4mM、炭酸水素ナトリウム 3.7g/L)に10%ウシ胎児血清(FBS、JR Scientific, Woodland CA)を添加し軟骨細胞培養用培地として使用した。この培地を12穴プレート(Falcon BioCoat collagen)に入れ、さらにこれを予めオートクレーブ滅菌しておいたアルギン酸-キトサンハイブリッド

繊維2(約1~1.5cm×約1~1.5cm)を置いた後、そこに上記のようにして調製した軟骨細胞を添加した。初代軟骨細胞数(継代培養していないもの)を培地[フナコシ、DMEM(グルコース 4500mg/L+10%FBS)]にて0.5~1×10<sup>6</sup>個に調節し、それをプレートに置いた各繊維を入れた穴に添加した。1~2時間後にそれぞれに培地[DMEM(グルコース 4500mg/L)+10%FBS]1~2ccをさらに加え、培養器(SANYO MCO-17AI)に置き、5%CO<sub>2</sub>存在下、37℃の条件下で培養した。培養14日後の培養状況を電子顕微鏡写真と光学電子顕微鏡を撮り観察した。

#### 【0041】培養状況の観察

上記の条件の培養状況を光学顕微鏡(オリンパス製 PM-50 PB30、Phase contract ULWD0.30)および走査電子顕微鏡(日立製作所製)で写真を取り観察した。光学電子顕微鏡写真は通常の方法に従い撮影した。各試料(軟骨細胞が付着している繊維)をLactated Ringer液で洗浄し、0.1M リン酸緩衝液(PBS)に溶解した2.5%グルタルアルデヒド溶液で固定し、次に1%OsO<sub>4</sub>溶液と1%タンニン酸で固定し、

50～100%エタノール脱水を行いさらに臨界点乾燥を行った。最後に金でコーティングし、通常の手順で走査電子顕微鏡による観察・撮影を行った。また、その結果を図1～3に示す。図1はアルギン酸-キトサンハイブリッド繊維2を培養担体として用いた培養系で増殖した軟骨細胞の走査型電子顕微鏡写真である。軟骨細胞の増殖が悪いと細胞の形状が繊維状になるがこの培養系では軟骨細胞が紡錘状に良く増殖していることが分かる。図2はアルギン酸-キトサンハイブリッド繊維2を添加した培養系で生育した軟骨細胞及びそれらが産性した細胞外マトリックスを示す走査型電子顕微鏡写真である。良く生育した紡錘状の細胞に細胞外マトリックスの産生が観察される。図3はアルギン酸-キトサンハイブリッド繊維2を添加した培養系で生育した軟骨細胞の細胞外マトリックスの表面を示す走査型電子顕微鏡写真である(図2の電子顕微鏡写真の倍率を上げたもの)。増殖した軟骨細胞表面にタイプIIコラーゲンがよく産生していることが判る。以上のようにアルギン酸-キトサンハイブリッド繊維を培養担体として用いた培養系の細胞は紡錘状によく生育し、タイプIIコラーゲン様繊維で覆われており、細胞がこのような細胞外マトリックスを良く分泌していることが分かる。ハイブリッド繊維はこれまで報告された担体と比較して、軟骨細胞の分裂・増殖、タイプIIコラーゲンの産生において明らかに優れている。

【図1】



またハイブリッド繊維は、Vicrylやアルギン酸繊維単独と比べて担体としての重要な性質である軟骨細胞の接着性に優れている。

【0042】本発明の酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体を含む成形物を軟骨細胞培養用の担体として用いると、軟骨細胞の増殖や細胞外マトリックス形成に顕著に優れた効果を示す。従って本発明は変形関節症などの軟骨欠損部位に培養軟骨細胞を移植したり、培養軟骨細胞でコートされたハイブリッド繊維あるいはその構造体をあてがうことにより軟骨を再生させることに応用される。さらにこのような構造体は骨、靱帯、血管、肝細胞培養担体として再生医療分野で広く応用を可能とするものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】 アルギン酸-キトサンハイブリッド繊維2を添加した培養系で増殖した軟骨細胞の形状を示す走査型電子顕微鏡写真である。

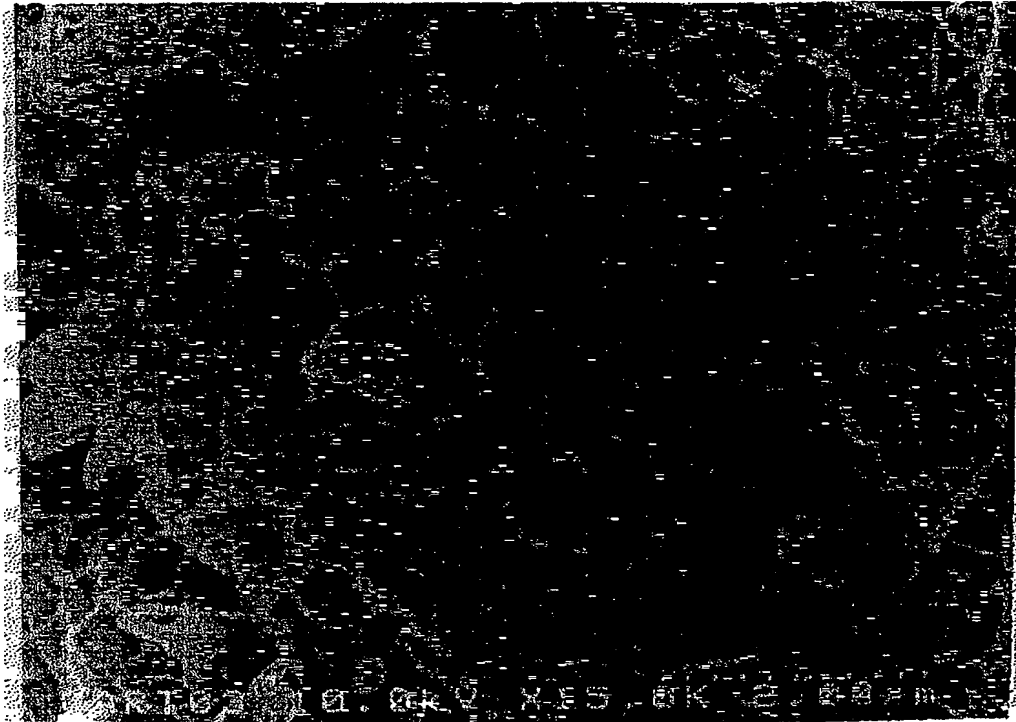
【図2】 アルギン酸-キトサンハイブリッド繊維2を添加した培養系で増殖した軟骨細胞及び該細胞が分泌した細胞外マトリックスを示す走査型電子顕微鏡写真である。

【図3】 アルギン酸-キトサンハイブリッド繊維2を添加した培養系で増殖した軟骨細胞が産生したタイプIIコラーゲンの形状を示す走査型電子顕微鏡写真である。

【図2】



【図3】



---

フロントページの続き

(72)発明者 戸倉 清一  
大阪府吹田市泉町5-13-16-103  
(72)発明者 西村 紳一郎  
北海道札幌市中央区北9条西16丁目1-1  
-302  
(72)発明者 岩崎 倫政  
北海道札幌市中央区北3条西14丁目1-21  
ライオンズマンション植物園第2 803  
号

(72)発明者 田村 裕  
大阪府茨木市中村町1-7  
Fターム(参考) 4B029 AA21 BB11 CC02 CC11  
4B033 NA01 NA16 NB02 NB14 NB48  
NB49 NB65 NB70 NC04 NC14  
ND12  
4B065 AA90X BC47 BC50 CA44  
4C081 AB02 AB04 CD041 CD051  
CD071 CD081 CD091 CD34  
DA04 DA05 EA02



**METHOD FOR CULTURING CHONDROCYTE AND SUBSTRATE FOR REGENERATING CARTILAGINOUS TISSUE**

**Patent number:** JP2002291461  
**Publication date:** 2002-10-08  
**Inventor:** TOKURA SEIICHI; NISHIMURA SHINICHIRO; IWASAKI TOMOMASA; TAMURA YUTAKA  
**Applicant:** NISHIMURA SHINICHIRO;; HOKKAIDO ELECTRIC POWER;; SEIBUTSU YUKI KAGAKU KENKYUSHO  
**Classification:**  
- **international:** C12M1/00; A61L27/00; C12M3/00; C12N5/06; C12N11/10  
- **european:**  
**Application number:** JP20010096445 20010329  
**Priority number(s):** JP20010096445 20010329

AF

[Report a data error here](#)

## Abstract of JP2002291461

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a substrate for transplanting a cartilaginous tissue suitable for restoration of cartilage deficiency. SOLUTION: A formed product containing a composite of an acidic biopolymer and a basic biopolymer is used as a culture carrier to culture chondrocytes.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**